

ホタル生物発光に対するリポソームの増感効果と ATP 高感度計測への応用

学位論文内容の要旨

ホタル生物発光は化学・生物発光反応のなかで最も発光量子収率が高く、発光量はアデノシン 5'-トリリン酸 (ATP) 濃度に依存することから、現在、ATP の高感度計測として様々な分野で利用されている。食品衛生関係においては、食品の安全確保のために細菌などによる環境汚染のモニタリングが重要になってきている。生きた細胞中には ATP が存在することから、ATP を迅速かつ高感度に検出できるホタル生物発光法は衛生環境の清浄度のモニタリング法として注目されている。また、生体物質を高感度に測定するため、ATP を産出する酵素を標識体に用いる酵素免疫測定法が構築され、その検出反応にホタル生物発光法が応用されている。より微量の菌体および生体物質を検出するため、また、それらのその場分析を可能とするマイクロ分析システムを構築するため、ホタル生物発光法の検出感度をより一層向上することが重要な研究課題となっている。

そこで本論文は、ホタル生物発光法のより一層の高感度化を目的として、検出下限付近の低濃度領域において有効な増感剤の開発を行った。増感剤には化学発光系の増感剤として有効であった分子集合体に着目し、界面活性剤ミセル、水溶性高分子ならびにリン脂質二分子膜からなるリポソームを用いて検討した。また、増感剤として最も有効であったカチオン性リポソームについて、増感機構を考察した。さらに、増感剤にリポソームを用いて、大腸菌数の計測ならびに ATP 産出酵素であるアセトトキナーゼの酵素活性の測定を行い、ホタル生物発光法の実用分析においてもリポソームが増感剤として有効であることを検証した。

本論文はこれらの経緯をまとめたもので、全 7 章から構成されている。以下に各章の概要を示す。

第 1 章は序論であり、本研究の背景と目的について述べている。

第 2 章では、種々の分子集合体を用いて、ホタル生物発光に対して増感剤として作用

する分子集合体を検討した。その結果、正電荷を有するジエチルアミノエチルーデキストランならびにリポソーム共存下で発光強度それぞれ約 2 倍および約 4 倍増大することを見いだした。

第 3 章では、リポソームに正電荷を付与する物質として、第一級アミン、第 4 級アミンおよびカチオン性コレステロールを用いてリポソームを調製し、発光強度への影響を検討した。その結果、リン脂質とカチオン性コレステロールであるジエチルアミノエチルーカルバモイルコレステロール (DEAE-chol) からなるリポソームが増感剤として最も有効であり、ATP の検出下限を 10 倍向上させることを見出した。

第 4 章では、カチオン性リポソーム共存下でのホタル生物発光の増感機構を膜表面電位と発光化学種に着目して考察した。その結果、リポソーム膜の表面における正電荷の割合が増大すると、ホタル生物発光の発光強度も増大することがわかった。すなわち、正電荷のリポソーム膜表面において、負に帯電しているホタル生物発光の反応物が静電的相互作用によって局在化し、反応速度が増大したため、発光強度が増大したものと考えた。一方、発光スペクトルでは、長波長側の発光の割合が減少した。これは、二種類ある発光化学種のうち、発光量子収率が低く、長波長側にピークを持つオキシルシフェリンのモノアニオン型から、発光量子収率が高く、短波長側にピークを持つオキシルシフェリンのジアニオン型へ平衡が移動したことが考えられ、そのために発光強度が増大したものと考えた。

第 5 章では、増感剤に DEAE-chol 含有リポソームを用いて、ホタル生物発光法による大腸菌数を計測した。最初に、溶菌剤であるトリクロロ酢酸共存下における増感効果を検討した。その結果、溶菌剤共存下においても、酵素活性がある状態である限り、増感効果が発揮することがわかった。次に、大腸菌数の計測を行った結果、DEAE-chol 含有リポソーム共存下において、非共存下と比べて大腸菌数の検出下限が 4.5 倍向上することが明らかになった。

第 6 章では、DEAE-chol 含有リポソームを用いて生物発光免疫測定法の高感度化を目指し、ATP 産生酵素活性の測定の高感度化を検討した。ATP 産生酵素にはアセテートキナーゼを使用した。最初に、ATP の最適生成条件を決定し、ついで DEAE-chol 含有リポソーム共存下での増感効果を検討した。その結果、DEAE-chol 含有リポソーム共存下においてアセテートキナーゼの活性を約 2 倍高感度に測定できることがわかった。

第 7 章では、本論文の総括を行っている。

学位論文審査の要旨

主査	教授	上 舘 民 夫
副査	教授	高 井 光 男
副査	教授	木 下 晋 一
副査	教授	棟 方 正 信
副査	助教授	谷 博 文

学 位 論 文 題 名

ホタル生物発光に対するリポソームの増感効果と ATP 高感度計測への応用

ホタル生物発光は化学・生物発光反応のなかで最も発光量子収率が高く、発光量はアデノシン5'-トリリン酸(ATP)濃度に依存することから、現在、ATPの高感度計測として様々な分野で利用されている。食品衛生関係においては、食品の安全確保のために細菌などによる環境汚染のモニタリングが重要になってきている。生きた細胞中にはATPが存在することから、ATPを迅速かつ高感度に検出できるホタル生物発光法は衛生環境の清浄度のモニタリング法として注目されている。また、生体物質を高感度に測定するため、ATPを産出する酵素を標識体に用いる酵素免疫測定法が構築され、その検出反応にホタル生物発光法が応用されている。したがって、衛生環境の管理精度ならびに臨床診断の信頼性のより一層の向上のため、また、それらのその場分析を可能とするマイクロ分析システムを構築するため、ホタル生物発光法の検出感度をより一層向上することは重要な研究課題である。本研究の目的は、ホタル生物発光法の検出感度の向上を目的として、ATPの検出下限付近の低濃度領域において有効な増感剤の開発を行うことである。また、増感剤として最も有効であるカチオン性リポソームについて、増感機構を明らかにすることである。さらに、大腸菌数の計測ならびにATP産出酵素であるアセトキナーゼの酵素活性測定において、リポソームがホタル生物発光法の増感剤として有効であること明らかにすることも目的としている。

本論文は7章から構成されており、第1章では本研究の背景と目的について述べられている。以下に著者が見出した主要な成果を述べる。

(1) 種々の分子集合体を用いて、ホタル生物発光に対し増感剤として有効な分子集合

体の検討を行ない、正電荷を有するジエチルアミノエチルーデキストランならびにリポソーム共存下で発光強度それぞれ約2倍および約4倍増大することを見いだした。

(2) リポソームに正電荷を付与する物質として、第一級アミン、第4級アミンおよびカチオン性コレステロールを用いてリポソームを調製し、発光強度への影響を検討した。その結果、リン脂質とカチオン性コレステロールであるジエチルアミノエチルーカルバモイルコレステロール (DEAE-chol) からなるリポソームが増感剤として最も有効であり、ATPの検出下限を10倍向上させることを見出した。

(3) カチオン性リポソーム共存下でのホタル生物発光の増感機構を膜表面電位と発光化学種に着目して考察した。その結果、リポソーム膜の表面における正電荷の割合が増大すると、ホタル生物発光の発光強度も増大することがわかった。すなわち、正電荷のリポソーム膜表面において、負に帯電しているホタル生物発光の反応物が静電的相互作用によって局在化し、反応速度が増大するため、発光強度が増大することを明らかにした。一方、発光スペクトルでは長波長側の発光の割合が減少した。これは二種類ある発光化学種のうち、発光量子収率が低く、長波長側にピークを持つオキシルシフェリンのモノアニオン型から、発光量子収率が高く、短波長側にピークを持つオキシルシフェリンのジアニオン型へ平衡が移動するために発光強度が増大することを明らかにした。

(4) 増感剤に DEAE-chol 含有リポソームを用いて、ホタル生物発光法による大腸菌数を計測した。溶菌剤であるトリクロロ酢酸共存下における増感効果を検討した。その結果、酵素活性がある状態である限り、増感効果が発揮することを見出した。つぎに、DEAE-chol 含有リポソーム共存下において、大腸菌数の計測を行った。その結果、非共存下と比べて大腸菌数の検出下限が4.5倍向上することを明らかにした。

(5) DEAE-chol 含有リポソームを用いて生物発光免疫測定法の高感度化を目指し、ATP産生酵素活性の測定の高感度化を検討した。ATP産生酵素にはアセテートキナーゼを使用した。最初に、ATPの最適生成条件を決定し、ついで DEAE-chol 含有リポソーム共存下での増感効果を検討した。その結果、DEAE-chol 含有リポソーム共存下においてアセテートキナーゼの活性を約2倍高感度に測定できることがわかった。

これを要するに、著者はホタル生物発光法の ATP に対する検出感度をより一層向上するため、増感剤としてリン脂質二分子膜からなるリポソームを開発し、大腸菌体数および ATP 産生酵素の活性測定などの実用分析に応用することにより、ATP の高感度な検出システムを開発したものであり、生物機能化学および生物計測工学の発展に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。